

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-514513
(P2001-514513A)

(43) 公表日 平成13年9月11日 (2001.9.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 9/96		C 1 2 N 9/96	
9/02		9/02	
// (C 1 2 N 9/02		(C 1 2 N 9/02	
C 1 2 R 1:645)		C 1 2 R 1:645)	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願平10-539103	(71) 出願人	ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ ブ
(86) (22) 出願日	平成10年3月10日 (1998.3.10)		デンマーク国, デーコ—2880 バグスバ エルト, ノボ アレ
(85) 翻訳文提出日	平成11年9月13日 (1999.9.13)	(72) 発明者	セーレンセン, ニールス ヘンリク
(86) 国際出願番号	P C T / D K 9 8 / 0 0 0 8 9		デンマーク国, デーコ—2880 バグスバ エルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク
(87) 国際公開番号	W O 9 8 / 4 0 4 7 1		アクティーゼルスカブ
(87) 国際公開日	平成10年9月17日 (1998.9.17)	(72) 発明者	ラスムッセン, グレーテ
(31) 優先権主張番号	0 2 6 9 / 9 7		デンマーク国, デーコ—2880 バグスバ エルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク
(32) 優先日	平成9年3月12日 (1997.3.12)		アクティーゼルスカブ
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外4名)
(31) 優先権主張番号	0 3 6 6 / 9 7		
(32) 優先日	平成9年4月1日 (1997.4.1)		
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラッカーゼを含んで成る貯蔵安定性液体製剤

(57) 【要約】

本発明は (1) ラッカーゼ、(11) 少なくとも一種のボリアルコールを含んで成るラッカーゼを含んで成る貯蔵安定液体製剤であって、当該ラッカーゼの至適pHよりもアルカリ性であるpHを有する製剤に関する。本発明の更なる目的はラッカーゼを含んで成る液体製剤の貯蔵安定性を改善するための方法、及び当該液体製剤のパーソナルケア用途、又は漂白もしくは繊維用途、例えば布帛の染色のための利用に関する。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】**1. 液体製剤であって：**

(i) ラッカーゼ；

(ii) 少なくとも一種のポリアルコール；

を含んで成り、当該ラッカーゼの至適pHよりもアルカリ性であるpHを有する液体製剤。

2. 前記ポリアルコールがポリマーもしくはそのモノマー、又は糖、例えば単糖、二糖、オリゴ糖もしくは多糖である、請求項1記載の液体製剤。

3. 前記ポリアルコールがポリアルキレンオキシド(PAO)、例えばポリメチレングリコール(PMG)、ポリエチレングリコール(PEG)を含むポリアルキレングリコール類(PAG)、メトキシポリエチレングリコール類(mPEG)及びポリプロピレングリコール類、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリエチレンーマレイン酸無水物共重合体、ポリスチレンーリンゴ酸無水物共重合体、カルボキシメチルーデキストラン類を含むデキストラン類、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシエチルセルロース及びヒドロキシプロピルセルロースを含むセルロース類、キトサンの加水分解物、デンプン、例えばヒドロキシエチルデンプン及びヒドロキシプロピルデンプン、グリコーゲン、グリセロール、ソルビトール、アガロース及びそれらの誘導体、グアーゴム、プルラン、イヌリン、キサントランゴム、カラギーナン、ペクチン、アルギン酸加水分解物、バイオポリマー、ソルビトール、グルコース、マンノース、ガラクトース、アラビノース、グロース、キシロース、トレオース、ソルボース、フルクトース、グリセロール、マルトース、セロビオース、スクロース、アミ

ロース、アミロペクチン、モノプロピレングリコール(MPG)である、請求項2記載の液体製剤。

4. 前記ポリアルコールとしてポリマー及び／又は糖を用いる、請求項2～3のいずれか1項記載の液体製剤。

5. 前記ポリマーがポリアルキレンオキシド(PAO)、好ましくはポリアルキレ

ングリコール(PAG)、特にプロピレングリコールである、請求項2～4のいずれか1項記載の液体製剤。

6. 前記糖がグルコースである、請求項2～4のいずれか1項記載の液体製剤。

7. 前記ポリマー及び／又は糖が200da～8,000da、好ましくは400～7,000da、特に6,000の分子量を有する、請求項2～6のいずれか1項記載の液体製剤。

8. 前記ポリアルコールが当該液体製剤の5～75%、好ましくは10～60%、特に20～50%を占める、請求項1～7のいずれか1項記載の液体製剤。

9. 当該液体製剤のpHを調節するためにpH調節剤を添加している、請求項1～8のいずれか1項記載の製剤。

10. 当該液体製剤のpHが前記ラッカーゼのpHよりも0.5～5.5pH単位、好ましくは1～4pH単位アルカリ性である、請求項1～9のいずれか1項記載の製剤。

11. 前記ラッカーゼが植物又は微生物起源、特に細菌又は真菌起源である、請求項1～10のいずれか1項記載の液体製剤。

12. 前記ラッカーゼがミセリオフソラ属の種の糸状菌、特にミセリオフソラ・サーモフィラに由来する、請求項11記載の製剤。

13. 当該製剤のpHが7～12、好ましくは7.5～11である、請求項12記載の製剤。

14. 前記ラッカーゼがポリボルス属の種の糸状菌、特にポリボル

ス・ピンシトウスに由来する、請求項11記載の製剤。

15. 当該製剤のpHがpH5.5～11、好ましくは6.5～9.5の範囲に属する、請求項14記載の製剤。

16. 抗微生物、分散剤及び／又は粘度調節剤を更に含んで成る、請求項1～15のいずれか1項記載の製剤。

17. 水性製剤である、先の請求項のいずれか1項記載の製剤。

18. ラッカーゼの貯蔵安定性を改善するための方法であって、当該ラッカーゼの至適pHよりも0.5～5.5pH単位アルカリ性であるpHにおいてポリアルコールの存在下で当該ラッカーゼを貯蔵することによる方法。

19. パーソナルケア用途、例えば毛髪染色のための請求項 1～17のいずれか 1 項記載のラッカーゼを含んで成る液体製剤の利用。

20. 布帛の漂白又は染色のための請求項 1～17のいずれか 1 項記載のラッカーゼを含んで成る液体製剤の利用。

【発明の詳細な説明】

ラッカーゼを含んで成る貯蔵安定性液体製剤

発明の分野

本発明はラッカーゼを含んで成る貯蔵安定性液体製剤、ラッカーゼを含んで成る液体製剤の貯蔵安定性を改善するための方法、及びパーソナルケア用途のための、又は漂白のための、又は繊維用途、例えば布帛の染色のための当該液体製剤の利用に関する。

発明の背景

工業用酵素は一般に粒状固体（例えば、任意的に何らかのコーティングの施された粉末又は顆粒形態）又は水性溶液として製剤化されている。

多くの固体製剤（例えば酵素粉末）はダスト形成が容易に起こるという欠点を有する。これは特別な注意を払わない限り、周囲環境の汚染をもたらすことがあり、その結果かかる組成物を取り扱う者の健康に危険を及ぼす。

水性液体酵素製剤は本質的にダスト形成の危険性がない。事実上全ての酵素が水の存在下でその活性を発揮するという事実に基づき、遊離（例えば未封入又は未コート）酵素を含んで成る貯蔵安定性製剤を調製することは一般に不可能である。

現在有用な水性液体酵素製剤は操作することが可能な時間枠が比較的短く、なぜなら酵素活性は冷却しながら貯蔵しないと数週間の貯蔵を経て許容されない程の低いレベルにまで低下するからである。

Feng Xuら (1996) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1292, p.

303-311は様々なラッカーゼの安定性が、ABTSとの1時間の予備インキュベーション後にpH及び温度依存性であることを示す。

Palmierrら(1993), *Applied Microbiol, Biotechnol.*, 39, p. 632-636は25°Cでインキュベーションした特異的なラッカーゼがpH3でよりもpH7で300分の間（即ち6時間）安定であることを示す。

かくして、1日よりも長い時間貯蔵安定性であるラッカーゼを含んで成る液体製剤についてのニーズがある。本発明はかかるニーズを充足させる製剤を提供す

る。

発明の概要

本発明の目的は長期間にわたり10～60℃で貯蔵安定性であるラッカーゼを含んで成る貯蔵安定性液体製剤を提供する。

液体製剤は(i) ラッカーゼ及び(ii) 少なくとも一種のポリアルコールを含んで成り、当該製剤はラッカーゼの至適pHよりもアルカリ性のpHを有し、注目のラッカーゼの至適pHのpHを有するポリアルコール抜きに対応の製剤と比べて改善された貯蔵安定性又は棚寿命を有する。

ラッカーゼ

ラッカーゼ(ベンゼンジオール:酸素オキシドリダクターゼ) Enzyme Nomenclature (1992) Academic Press, Inc. に従うと、E. C. クラス1. 10. 3. 2) はフェノール類の酸化を触媒する多重銅含有酵素である。ラッカーゼ媒介酸化は適当なフェノール系基質からのアリアルオキシ基中間体の生成をもたらす; このようにして生成された中間体の最終的なカップリングは二量体、オリゴ及びポリマー反応生成物の組合せを供する。所定の反応生成物はケラチン質繊維、例えば毛髪、ウール及び繊維の染色のために適当な染料を

生成するのに利用されうる。

ラッカーゼは様々な微生物起源、特に細菌及び真菌(糸状菌類及び酵母等)から得られ、そしてラッカーゼの適当な例はとりわけ真菌から得られ、例えばアスペルギルス(*Aspergillus*)、ニューロスポラ(*Neurospora*) (例えば*N. crassa*)、ポドスポラ(*Podospora*)、ボツリチス(*Botrytis*)、コリビア(*Collybia*)、フォメス(*Fomes*)、レンチヌス(*Lentinus*)、プレウロトウス(*Pleurotus*)、トラメテス(*Trametes*) [その一部の種/株は様々な名称により知られているか及び/又は過去に別の属内に分類されていた: 例えば、トラメテス・ピロッサ(*T. villosa*) = *T. pinsitus* = ポリポルス・ピンシチス(*Polyporus pinsitis*) (*P. pinsitis* 又は *P. ピロッサ* (*P. villosus*) としても知られる) = コリオルス・ピンシトウス(*Coriolus pinsitus*)]、ポリポルス、リゾクトニア(*Rhizoctonia*) (例えば、*R. ソラニ*)、コプリヌ

ス (Coprinus)、(例えば、C. プリカチリス (C. plicatilis)、コプリヌス・シネレウス (C. cinereus))、プサチレツラ (Psatyrella)、ミセリオフソラ (Myceliophthora)、(例えば、M. サーモフィラ (M. thermophila))、シタリジウム (Schytalidium)、フレビア (Phlebia) (例えば P. ラジタ (P. radita) ; WO 92/01046参照)、コリオルス (Coriolus) (例えば、C. ハーストウス (C. hirsutus) ; 特開平第2-238885号参照)、ピリキュラリア (Pyricularia) 又はリジドポルス (Rigidoporus) の株から得られるラッカーゼである。

本発明との関係において好適なラッカーゼにはミセリオフソラ・サーモフィラ (Myceliophthora thermophila) から入手できるラッカーゼ及びポリポルス・ピンシトウス (P. pinsitus) から入手できるラッカーゼが挙げられる。

本発明の液体製剤はその他の成分を含んでも含まなくてもよい。その他の考えられる成分には、ラッカーゼの基質又は媒介剤 (mediator)、pH調節剤、抗微生物剤、分散剤及び／又は粘度調節剤が挙げられる。

本発明は更にラッカーゼの貯蔵安定性を改善するための方法であって、ラッカーゼをポリアルコールの存在下で、ラッカーゼの至適pHよりも0.5~5.5pH単位アルカリ性であるpHで貯蔵することによる方法にも関連する。

最後に、本発明はパーソナルケア用途、例えば毛髪染色、漂白、及び繊維用途、例えば布帛の染色のための本発明の液体製剤の利用に関連する。

図面の簡単な説明

図1はミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼ (120LAMU/g) 及び30%のPEG 6,000を含んで成る本発明の液体製剤のpH9.0での一週間の貯蔵期間における比残留酵素活性を示す。

図2はミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼ及びポリアルコール、並びに種々のバッファーを含んで成る液体製剤のパーセンテージ残留活性を示す。

図3はミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼ原材料のポリアルコール及び低温殺菌の効果を示す。

図4はミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼのpH9, 9.5及び10の残留活性を示す。

図5は40℃で1～16日の期間の間に残留活性として測定したバッファー中のミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼ及びポリポルス・ピンシトウスラッカーゼの安定性を示す。

図6は1) 10% w/wのプロピレングリコール及び2) 10%

w/wのプロピレングリコールと3% w/wのグリコースとの組合せを含んで成る液体製剤中での40℃で21週間のミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼの長期貯蔵安定性を示す。

発明の詳細な説明

本発明の目的は改善された貯蔵安定性を有するラッカーゼを含んで成る液体製剤を提供し、かかる製剤は10～60℃、好ましくは20～45℃の温度で保存したときに大半の割合の残留酵素活性を維持する。

本発明者は、ラッカーゼ及びポリアルコールを含んで成る液体製剤であってpHがラッカーゼの至適pHよりもアルカリ性である製剤が改善された貯蔵安定性又は棚寿命を有することを見い出した。

1日超から数週間、そして更にある場合には数週間の範囲において長い棚寿命を有する改善された貯蔵安定性液体製剤を得るには、pHは注目のラッカーゼの至適pHよりも0.5～5.5pH単位、典型的には1～4pH単位アルカリ性でなくてはならない。

「改善された貯蔵安定性液体製剤」は少なくとも本発明との関連においては、一定のpHで所定の期間後の注目のラッカーゼの残留酵素活性の4℃で冷却下での同じ一定のpHでの同じ所定の期間後の酵素活性との対比におけるパーセンテージを基準に決定される。4℃での冷却はラッカーゼ、例えばミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼを含んで成る液体製剤の貯蔵の慣用の手段である。

「大半の残留酵素活性」とは、対応の条件下で4℃で保存した注目のラッカーゼの酵素活性の少なくとも20%、より良好には30%以上、例えば50%又は60%以上、更に良好には70%以上、好ましくは80%以上、特に90%以上、そして更には100%まで維持された酵素活性を意味する。

pH

本発明の液体製剤のpH（それは注目のラッカーゼの至適pHよりもアルカリ性である）は製剤の成分に由来する「天然」pHであってよい。もしこの液体製剤のこの「天然」pHが本発明の仕様に従っていないなら、そのpHはpH調節剤、例えばバッファーの利用により所望のpHにまで調整しなくてはならない。その液体製剤が特にどのようなpHを有さなくてはならないかは特定のラッカーゼに依存するものと理解され、なぜならラッカーゼの至適pHは4～8と様々であるからである。

特定のラッカーゼの至適pHは基質、安定剤（即ち、本件ではポリアルコール）、バッファー及びその他の成分の存在に依存する。従って、当該ラッカーゼの至適pHはそれが貯蔵される製剤に相当する製剤の中で測定しなくてはならない。当業者は注目のラッカーゼの至適pHを容易に決定することができ、そしてその情報から本発明の貯蔵安定性液体製剤を容易に調製できる。

ラッカーゼ

注目のラッカーゼは上記の任意のラッカーゼであってよい。ラッカーゼはかなり様々な起源から得られ、そしてその構造（分子量、組成）及びその特性（基質に関する特異性、至適pH、等電点（pI）等）との関連で比較的不均質なグループである。

本発明に関して特に考慮されるラッカーゼの例には植物起源、例えばラス（*Rhus*）種のラッカーゼ、ラッカー樹木由来のラッカーゼ、並びに微生物起源由来のラッカーゼ、例えば細菌及び真菌ラッカーゼ、例えばリゾクトニア・プラクトコラ（*Rhizoctonia praticola*）ラッカーゼ（Reinhammar, B. B. A. 205, 35-47 (1970) ; Bollagら (1978) 、Can. J. Microbiol. 25, 229-233）、ミセリオフソラ由来のラッカーゼ、特にミセリオフソラ・サーモフィラ株由来の

ラッカーゼ（W095/33836参照）、ポリポルス、特にポリポルス・ピンシトウス株由来のラッカーゼ（W096/00290参照）、シタリジウム（*Scytalidium*）種、特にS. サーモフィルム（*S. thermophilum*）由来のラッカーゼ（W095/33837参照）、ピリコラリア（*Pyricularia*）種、特にP. オリザ（*P. oryzae*）由来のラッカーゼ、コプリヌス・シネレウス（*Coprinus cinereus*）由来のラッカーゼが挙げられる。

本発明の液体製剤中のラッカーゼの濃度

本発明の液体製剤中のラッカーゼの濃度はその意図する用途に依存し、それ故低濃度から高濃度に至るまで様々である。注目の用途（例えば毛髪染色、布帛漂白、布帛染色、等）の当業者はどの程度のラッカーゼの最終濃度が必要であるかを知っている。技術的に認められる本発明の液体製剤の改善された調製安定性又は棚寿命は、製品 1 ml 当り少なくとも 1 mg の酵素タンパク質の濃度から、製品の混合が不可能となるまで粘度が上昇するに至るまでの濃度のラッカーゼの濃度とは独立して得られる。

ミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼ製剤

組換ミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼの至適pHはW095/33836 (Novo Nordisk) によれば、基質としてシリングアルダジンをうい、6.5である。従って、このラッカーゼを含んで成る製剤の場合、そのpHは本発明に従うとトリスバッファの存在下で6.5よりもアルカリ性であるべきであり、そして好ましくは7~12、特に7.5~11の範囲にあるべきである。

0.25Mのグリシンバッファ、pH9.0中の10%のモノプロピレングリコール(MPG)、0.2%のProxel (商標) の中でのミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼは40°Cで4週後に84%の酵素活性を維持する。pH9.0では、パーセンテージ残留活性はpH9.5よりも高いことが認められた。

pHをpH9からpH10に高める効果は実施例5に記載し、そして図4に示す。ミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼはpH9.0で一層安定であるようであり、25°C及び40°Cで4週間貯蔵した後にそれぞれ93%及び84%の活性が維持される。

ポリポルス・ピンシトウスラッカーゼ製剤

更に、組換ポリポルス・ピンシトウスラッカーゼはW096/00290 (Novo Nordisk) に開示の通り、基質としてシリングアルダジンをうい、5~5.5の至適pHを有する。

本発明に従って、ポリポルス・ピンシトウス由来のラッカーゼ及びポリアルコールを含んで成る液体製剤は5又は5.5よりもアルカリ性であるべきであり、そして約5.5~11、特に6~9.5にあるべきことが好ましい。

60%のPEG 6,000, pH6.0液体中のポリボルス・ピンシトゥスラッカーゼは実施例1に示す通りに40℃において、14日後に100%の残留活性を有し、そして4週間後に65%の残留活性を有した。

ポリアルコール

ラッカーゼを含んで成る液体製剤の改善された貯蔵安定性を得るには、少なくとも一種のポリアルコールがこの製剤の安定化のために存在していなくてはならない。

何ら理論に拘束されるわけではないが、ポリアルコールは水活性を弱め、そして更にはラッカーゼが沈殿しないこと及び熱変性に委ねられないことを確保するものと信じられている。

本発明者はポリマー及びそのモノマー、並びに単糖、二糖、オリゴ糖及び多糖類が当該製剤の所望の安定性を得るのに適当であることを見出した。

本発明の液体製剤に利用し得るポリアルコールの例には、ポリアルキレンオキシド(PAO)、例えばポリアルキレングリコール(PAG)

、例えばポリメチレングリコール、ポリエチレングリコール(PEG)、メトキシポリエチレングリコール(mPEG)及びポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリエチレンー無水マレイン酸共重合体、ポリスチレンーリンゴ酸無水物共重合体、デキストラン、例えばカルボキシメチルデキストラン、セルロース、例えばメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシエチルセルロース及びヒドロキシプロピルセルロース、キトサンの加水分解物、デンプン、例えばヒドロキシエチルデンプン及びヒドロキシプロピルデンプン、グリコーゲン、アガロース及びその誘導体、グアーゴム、プルラン、イヌリン、キサントランゴム、カラギーナン、ペクチン、アルギン酸加水分解物、バイオポリマー、ソルビトール、グルコース、マンノース、ガラクトース、アラビノース、グロース、キシロース、スレオース、ソルボース、フルクトース、グリセロール、マルトース、セロビオース、スクロース、アミロース、アミロペクチン、モノプロピレングリコール(MPG)が挙げられる。

好適な態様において、当該製剤はポリマー及び／又は糖をポリアルコールとして含んで成る。適当なポリマーはポリアルキレンオキシド(PAO)、好ましくはポリアルキレングリコール(PAG)、特にプロピレングリコールである。好適な糖はグルコースである。

本発明の態様において、ポリアルコールは100da~8,000da、好ましくは200~7,000daの範囲、例えば6,000の分子量を有し、そして本発明の液体製剤の5~75%、好ましくは10~60%、特に20~50%を占めることがある。

本発明の態様において、この液体製剤は水性製剤である。ラッカーゼは液状又は固体（非晶質及び／又は結晶質）、一般には粒状、例えば液相に分散された状態（即ち、スラリー）で存在していてよ

い。

更なる成分

本発明の液体製剤はラッカーゼ基質又は媒介剤を含んでいてもいなくてもよい。

本発明の液体製剤の態様においては、ラッカーゼ基質又は媒介剤、例えば染料前駆体を更に含んで成る（最終製品が染料組成物又は製品の場合）。これは、当該製剤が酵素消費型であること、及びそのpHが注目のラッカーゼの至適pHを超える特定の範囲内にあることを要する。

更なる成分には抗微生物剤、pH調節剤、分散剤、粘度調節剤及び／又は抗酸化剤が挙げられる。

抗微生物剤：抗微生物剤は微生物、例えば細菌、真菌生物、例えば糸状菌及び／又は酵母の増殖を阻害又は阻止する物質である。適当な抗微生物剤には、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸ナトリウム、ニパギン、パラベン等が挙げられる。Proxel（商標）は適当な抗微生物剤の商標である。

分散剤：分散剤（即ち、分散固体物質の分離（例えば沈殿）を阻止又は遅延させるのに役立つ物質）には、例えば所定の細く分割された粘土質（例えばカオリン（チャイナクレイ）、ベントナイト、フラー土等）、いわゆる「解凝集ポリマー」、並びに陰イオン型ポリマーの両親媒性材料が挙げられる。

粘度調節剤：本発明の組成物の態様の粘度を上昇させるのに適当な物質の例には様々なグレードのヒュームドシリカ（例えば、商標Aerosil, Cab-O-Sil又はTix-O-Silで販売）、ペントナイト、カオリン、細く分割された炭酸カルシウム、有機粘土（例えばClaytone（登録商標））、並びにポリマー材料、例えばヒドロキシプロピルセルロース（例えばNatrosil（商標））及びキサンタンゴムが挙げら

れる。

pH調節剤：本発明の組成物の一定の態様の中に組込むために適当なpH調節剤（即ち、本発明の組成物を水性媒体と接触させるとき、その媒体のpHを調整及び／又は維持（即ち、緩衝）するのに役立ち、当該製剤のpH感受性成分（例えば、その中に存在するラッカーゼ）と適合するpH値を供する）の例には、様々な無機及び有機塩類、例えばリン酸二水素カリウム（ KH_2PO_4 ）、炭酸水素ナトリウム（ NaHCO_3 ）、酢酸カリウム（ CH_3COOK ）、酢酸ナトリウム（ CH_3COONa ）及びクエン酸二水素カリウム、グリシンバッファー、トリス-Na-バッファーが挙げられる。

抗酸化剤：本発明の製剤の所定の態様では、その製剤の中に、その製剤の酸化感受性成分を酸化（例えば雰囲気酸素による）から守ることができる物質（抗酸化剤）を組込むことが好都合でありうる。かかる物質には、例えば、塩類、例えば有機系抗酸化剤、例えばメチオニン及びレシチンが挙げられる。

本発明の液体製剤の調製

本発明の液体製剤の調製に関し、その中に組込むラッカーゼが当初とる形態に主として依存して、数多くのアプローチが適用可能である。

ラッカーゼが不溶性な固体酵素調製品、例えば凍結乾燥又はスプレードライ微顆粒の形態である場合、又は少なくとも液体の中での溶解度が低い形態として得られる場合、それは単に水に分散させて水性液相とし、スラリーを形成することができる。

ラッカーゼ水性溶液として得られる場合、それは本発明の液体製剤の中に直接用いてよい。

ラッカーゼ基質

本発明との関係で使用する語「基質」とは、酵素により触媒され

る反応における反応体である物質を意味する。

ラッカーゼ基質を本発明の製剤の中に組込むのが適当な場合、この目的のために適当な酵素基質の種類は、注目のラッカーゼだけでなく、製剤の意図する用途にも依存するであろう。

(i) 媒介剤：本発明の態様において、この液体製剤はラッカーゼを、媒介剤として機能する可酸化性基質と一緒に含んで成る。この媒介剤は採用するラッカーゼと一緒に利用するために適当な任意の媒介剤であってよい。媒介剤の例には下記のものが挙げられる：ハライドイオン（例えば、クロリド及びブロミド）；一定の金属イオン（例えば Mn^{2+} ）；フェノール系物質〔例えばアセトシリンゴン、シリンガルデヒド、シリンジン酸、アルキルシリンゲート（例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、ヘキシル又はオクチルシリンゲート）、及びその他のシリンジン酸エステル〔例えば、様々な分子量のポリエチレングリコール(PEG)のシリンゲートエステル、例えばPEG 4,000シリンゲート〕、エチル3-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニル)アクリレート、p-ヒドロキシシンナミン酸、2,4-ジクロロフェノール、バニリン、7-ヒドロキシクマリン、6-ヒドロキシ-2-ナトイン酸、及びp-ヒドロキシベンゼン-スルホネート〕；2,2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホネート) (ABTS；例えば、W094/12620参照)；並びに10-メチルー、10-エチルー及び10-プロピルフェノチアジン（例えば、W094/12621参照）が挙げられる。その他の適当な媒介剤は例えば、W094/12619、W094/12620及びW094/12621に開示されている。

シリンゲート、フェノキサジン又はフェノチアジン型の媒介剤が本発明との関連において一般に極めて適当であり、そしてそのいくつかの例はアセトシリンゴン、メチルシリンゲート、10-フェノチ

アジンプロピオン酸、10-エチルフェノチアジン-4-カルボン酸、10-フェノキサジンプロピオン酸及び10-メチルフェノキサジンである（W094/12621に記載）。

媒介剤は一般に本発明の組成物の中に、当該組成物の $10^{-7} \sim 10^{-2} \text{mol/g}$ の量

で、そして往々にして当該組成物の $10^{-5} \sim 10^{-3} \text{mol/g}$ の量で存在する。

(ii) **染料前駆体**：本発明の製剤の更なる重要な態様はラッカーゼ（例えば上記のラッカーゼのいずれか）を、水の存在下でラッカーゼ触媒型酸化（一般には酸化性ラジカル形成）を受け、その後重合して特定の色の色素を形成する染料前駆体の形態における1又は複数種の可酸化性基質と共に含んで成る製剤である。かかるラッカーゼ媒介型染料形成は繊維（例えばウール、綿及び／又は合成品）、糸、毛皮、獣皮等の染色において、並びに例えば毛髪染色の如き利用に良好に適することの見いだされたヒトパーソナルケアの分野における重要な工業的用途を有する。

本明細書及び請求の範囲に用いる語「染料前駆体」とは、ラッカーゼの存在下での酸化により強く発色した染料を供する個々の物質のみならず、対応の状況での酸化によりそれ自体単独では強い色彩を有する生成物を供しないが、前記カテゴリーの強力に発色する物質存在下で酸化に委ねられたときに染料が発色する色彩の改変をもたらす個々の物質をも包含することを意図する。染料の色彩全体に対してかかる改変効果を及ぼす可酸化性物質（かかる物質は時折り「改質剤」と称される）はかくして本発明との関連において採用する語「染料前駆体」の意味の中に含まれる。

本発明の製剤の中に組込むために適当な染料前駆体の例には、限定することなく、芳香族ジアミン；ジアーミノ置換化芳香族カルボン酸及びそのエステル類；アミノフェノール類；フェノール類；ナ

フトール類；並びにシンナミン酸のフェノール系誘導体及びそのエステル類が含まれる。

芳香族ジアミンの例には以下のものが挙げられる：

- 2-メチルー1, 4-ジアミノベンゼン、
- 4-メチルーo-フェニレンジアミン、
- 1, 4-ジアミノベンゼン（p-フェニレンジアミン）、
- 2-メトキシ-p-フェニレンジアミン、
- 2-メチルー1, 4-ジアミノベンゼン（p-トルイレンジアミン）、

2-クロロ-1, 4-ジアミノベンゼン (o-クロロ-p-フェニレンジアミン)、

4-アミノジフェニルアミン (N-フェニル-p-フェニレンジアミン)、

1-アミノ-4-β-メトキシエチルアミノベンゼン (N-β-メトキシエチル-p-フェニレンジアミン)、

1-アミノ-4-ビス-(β-ヒドロキシエチル)-アミノベンゼン、

(N, N-ビス-(β-ヒドロキシエチル)-p-フェニレンジアミン、

1, 3-ジアミノベンゼン (m-フェニレンジアミン)、

2-メチル-1, 3-ジアミノベンゼン (2, 6-ジアミノトルエン)、

2, 4-ジアミノトルエン及び

2, 6-ジアミノピリジン。

ジアミノ置換化芳香族カルボン酸及びそのエステルの例には以下のものが含まれる：

2, 3-ジアミノ安息香酸、

3, 4-ジアミノ安息香酸、

及びそのエステル、例えば低級アルキルエステル (例えばメチル、エチル、プロピル、2-プロピル又はブチルエステル)。

アミノフェノール類の例には以下のものが含まれる：

1-ヒドロキシ-2-アミノベンゼン (o-アミノフェノール)、

1-ヒドロキシ-3-アミノベンゼン (m-アミノフェノール)、

1-メチル-2-ヒドロキシ-4-アミノベンゼン (3-アミノ o-クレゾール)、

1-メチル-2-ヒドロキシ-4-β-ヒドロキシエチルアミノベンゼン (2-ヒドロキシ-4-β-ヒドロキシエチルアミノトルエン)、

1-ヒドロキシ-4-アミノベンゼン (p-アミノフェノール)、

1-ヒドロキシ-4-メチルアミノベンゼン (p-メチルアミノフェノール)

、

1-メトキシ-2, 4-ジアミノベンゼン (2, 4-ジアミノアニソール)、

1-エトキシ-2, 3-ジアミノベンゼン (2, 4-ジアミノフェネトール) 及び

1- β -ヒドロキシエチルオキシ-2, 4-ジアミノベンゼン (2, 4-ジアミノフェノキシエタノール)。

フェノール類及びナフトール類の例には以下のものが挙げられる：

1, 2-ジヒドロキシベンゼン (ピロカテコール)、

1, 3-ジヒドロキシベンゼン (レゾルシノール)、

1, 3-ジヒドロキシ-2-メチルベンゼン (2-メチルレゾルシノール)、

1, 3-ジヒドロキシ-4-クロロベンゼン (4-クロロレゾルシノール)、

1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼン (ピロガロール)、

1, 2, 4-トリヒドロキシベンゼン、

1, 2, 4-トリヒドロキシ-5-メチルベンゼン (2, 4, 5-トリヒドロキシトルエン)、

1, 2, 4-トリヒドロキシトルエン、

1, 5-ジヒドロキシナフタレン、

1, 4-ジヒドロキシベンゼン (ヒドロキノン) 及び

1-ヒドロキシナフタレン (α -ナフトール)。

シンナミン酸のフェノール系誘導体及びそのエステル例には以下のものが含まれる：

p-クマリン酸 (即ち、4-ヒドロキシシンナミン酸)、

カフェイン酸 (即ち、3, 4-ジヒドロキシシンナミン酸)、

シナピニン酸 (シナピン酸；即ち、3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシシンナミン酸)、

フェルリン酸 (即ち、4-ヒドロキシ-3-メトキシシンナミン酸)、

及び任意のこれらのエステル、例えば低級アルキルエステル (例えば、メチル、エチル、プロピル、2-プロピル又はブチルエステル)。

本発明との関連における染料前駆体としてのその他の注目の物質にはサリチル酸 (即ち、2-ヒドロキシ安息香酸) 及びそのエステル (例えば、低級アルキル

エステル、例えばメチル、エチル、プロピル、2-プロピル又はブチルエステル)が含まれる。

特に考慮される染料前駆体の例には下記の化合物を含んで成る群の化合物が挙げられる: p-フェニレンジアミン(PPD)、p-トルイレンジアミン(PTD)、クロロ-p-フェニレンジアミン、p-アミノフェノール、o-アミノフェノール、3,4-ジアミノトルエン、2-メチル-1,4-ジアミノベンゼン、4-メチル-o-フェニレンジアミン、2-メトキシ-p-フェニレンジアミン、2-クロロ-1,4-ジアミノベンゼン、4-アミノジフェニルアミン、1-アミノ-4-β-メトキシエチルアミノベンゼン、1-アミノ-4-ビス(β-ヒドロキシエチル)-アミノベンゼン、1,3-ジアミノベンゼン、2-メチル-1,3-ジアミノベンゼン、2,4-ジアミノトルエン、2,6-ジアミノピリジン、1-ヒドロキシ-2-アミノベンゼン、1-ヒドロキシ-3-アミノベンゼン、1-メチル-2-ヒドロキシ-4-アミノベンゼン、1-メチル-2-ヒドロキシ-4-β-ヒドロキシエチルアミノベンゼン、1-ヒドロキシ-4-アミノベンゼン、1-ヒドロキシ-4-メチルアミノベンゼン、1-メトキシ-2,4-ジアミノベンゼン、1-エトキシ-2,3-ジアミノベンゼン、1-β-ヒドロキシエチルオキシ-2,4-ジアミノベンゼン、フェナジン、例えば4,7-フェナジンジカルボン酸、2,7-フェナジンジカルボン酸、2-フェナジンカルボン酸、2,7-ジアミノフェナジン、2,8-ジアミノフェナジン、2,7-ジアミノ-3,8-ジメトキシフェナジン、2,7-ジアミノ-3-メトキシフェナジン、2,7-ジアミノ-3-メトキシフェナジン、3-ジメチル-2,8-フェナジンジアミン、2,2'-[(8-アミノ-7-メチル-2-フェナジル)イミノ]ビスエタノール、2,2'-[(8-アミノ-7-メトキシ-2-フェナジル)イミノ]ビスエタノール、2,2'-[(8-アミノ-7-クロロ-2-フェナジル)イミノ]

]ビスエタノール、2-[(8-アミノ-7-メチル-2-フェナジル)アミノ]エタノール、2,2'-[(8-アミノ-2-フェナジル)イミノ]ビスエタ

ノール、3-アミノ-7-(ジメチルアミノ)-2, 8-ジメチル-5-フェニルクロリド、9-(ジエチルアミノ)-ベンゾ[α]フェナジン-1, 5-ジオール、N-[8-(ジエチルアミノ)-2-フェナジニル]-メタンスルホンアミド、N-(8-メトキシ-2-フェナジニル)-メタンスルホンアミド、N, N', N'-テトラメチル-2, 7-フェナジンアミド、3, 7-ジメチル-2-フェナジンアミン、p-アミノ安息香酸、例えばp-アミノ安息香酸エチル、p-アミノ安息香酸グリセリド、p-アミノ安息香酸イソブチル、p-ジメチルアミノ安息香酸アミル、p-ジメチルアミノ安息香酸オクチル、p-ジエトキシアミノ安息香酸アミル、p-ジプロポキシアミノ安息香酸エチル、アセチルサリチル酸、イサチン誘導体及び2, 3-ジアミノ安息香酸。

(iii) ラッカーゼのためのその他の基質：ラッカーゼは食品用途又は高度に吸水性の材料の調製のためのフェノール系置換基を含む多糖類（例えばコムギもしくはもみがら由来のアラビノキシラン又はテンサイ及び近縁植物由来のペクチン）のゲル化を引き起こすために極めて適切であることが証明されている（例えばW096/03440参照）。同様に、ラッカーゼはリグノセルロース材料（例えば木材パルプ）からのリグノセルロースベース製品及びフェノール系多糖類、例えば上記のアラビノキシラン又はペクチンの調製において極めて有用な用途を有することが証明されている（例えば、W096/03546参照）。

例えば、適当なレベルのラッカーゼと、フェノール系多糖の形態におけるラッカーゼ基質を含んで成る本発明の製剤を提供すること

が適当であろう。かかる簡単に製造できる貯蔵安定製剤は上記の用途に利点のために採用できうる。

材料と方法

材料

酵素：

4℃で保存した任意の副次的な活性をもたず、且つ20mMのトリスバッファーの中で約pH7.0又は8.0で保存した高度に精製された組換ポリポルス・ピンシトウスラッカーゼ（3525LAGU/ml）。

低温殺菌済み及び未低温殺菌組換えリボソーム・サーモフィララッカーゼ (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmarkより製造された水性濃縮物; Mettler乾燥物質含有量18.5% w/w; 濃縮物1g当り約50mgの純粋ラッカーゼタンパク質)。

MESバッファー: (2-N-モルホリノーエタンスルホン酸) (Sigma 8250)。pHは3NのNaOH(Merck 1.06498)を用いて5.5に調整。

マレイン酸1.0M

マレイン酸37%paM*) 800380 23.2 g

脱ミネラル水、Milli-Q 200mlまで

23.2gのマレイン酸を秤量ボートの中で秤量し、そして150mlの水を連続攪拌しながら加える。溶解するまで攪拌する。

定量的にこの溶液を200mlのメスフラスコに移し、そして水で目印まで増量させる。

*) pro analysi Merck

トリスバッファー1.0M: ストック溶液

トリス〔ヒドロキシメチル〕アミノメタン 121.1 g Sigma T-1378

脱ミネラル水、Milli-Q 1.1 lまで

トリスバッファーを秤量ボートで秤量し、そして800mlの水を連続攪拌しながら加える。溶解するまで攪拌する。

定量的にこの溶液を1 lのメスフラスコに移し、そして水で目印まで増量する。

トリスバッファー25mM: pH7.50

トリスバッファー1.0M 25.0ml

マレイン酸、1.0M 5.0ml

脱ミネラル水 1 lまで

pHを7.50±0.05に調整

50mlのトリスバッファー1.0M (メスシリンダー) を1 lのメスフラスコの中に注ぎ、そして約700mlの水を加える。ここで5mlのマレイン酸1Mを加える。p

Hを 7.50 ± 0.05 に調整し、そして水で目印まで増量する。(pHはHClでは調整せず、その理由はラッカーゼ酵素に対する阻害効果にある)。

希釈培地

PEG 6000 paM 807491	25.0 g
トリトンX-100, Sigma T-9284	5.0 g
Milli-Q水	0.5 l まで

25.0 g のPEG 6000及び5.0 g のトリトンX-100を秤量ボートで秤量し、そして連続攪拌しながら400mlの水を加える。溶解するまで攪拌する。

定量的にこの溶液を0.5 l のメスフラスコに移し、そして水で目印まで増量する。

シリンガルダジン0.56mM : ストック溶液

シリンガルダジン無水物Sigma S-7896	10.0mg
エタノール96%	50ml

シリンガルダジンを50mlのメスフラスコの中で秤量し、そして50

mlのエタノールを加える。溶解するまで攪拌する(約3時間)。

シリンガルダジン0.28mM : 48%エタノール

シリンガルダジン0.56mM	25.0ml
脱ミネラル水 Milli-Q	50ml まで

25mlのシリンガルダジン0.56mM (ピペット一杯分) を50mlのメスフラスコに移す。水で目印まで増量する。

試験の検定 : シリンガルダジン0.056mM : 48%エタノール

シリンガルダジン0.28mM	2ml
エタノール 96%	4ml
脱ミネラル水 Milli-Q	10ml まで

この溶液は6%のエタノールに対して測定して、360nmで約2.2の吸収を有すべきである。

エタノール6%

エタノール 96%	62.5ml
-----------	--------

脱ミネラル水 Milli-Q

1000mlまで

62.5mlのエタノール96%（メスシリンダー）を1lのメスフラスコに移す。水で目印まで増量する。

トリスNa-バッファー（製剤中20mM）

グリシンバッファー

リン酸バッファー

ソルビトールシロップ（製剤中60%の乾燥物質）

PEG 6,000（製剤中30%又は60%の乾燥物質）

PEG 600（製剤中30%又は60%の乾燥物質）

Proxel

バッファー用イオン水

トリトン X-100

シリンガルダジン（Sigma S-7896）

マレイン酸（Merck 800 380）

トリス（SIGMA 7-9 T-1378）

装置

<COBAS>:FARA遠心分析器（Roche）

光度計 島津UV 2101 PC

方法

ラッカーゼ活性の測定（LACU）

LACU法はポリボルス・ピンシトゥス及びその他のラッカーゼの酵素活性の測定のために利用できる。

ラッカーゼ活性は好氣的条件下でのシリンガルダジンの酸化により測定する。発色する紫色を530nmで光学測定する。分析条件は19mMのシリンガルダジン、23.2mMの酢酸バッファーpH5.5、30℃、1分の反応時間とする。

1ラッカーゼ単位（LACU）はこれらの条件下で1分当り1.0マイクロモルのシリンガルダジンの変換を触媒する酵素の量である。

ラッカーゼ活性の測定（LAMU）

LAMU法はミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼの活性を測定するために用いる。1ラッカーゼ単位(LAMU)は下記の条件下で1分当り1.0マイクロモルのシリンガルダジンの変換を触媒する酵素の量である。

ラッカーゼはテトラメトキシアゾービスメチレンキノンを形成するシリンガルダジンの酸化を好気条件下で触媒する。発色する紫色を530nmで光学測定する。分析条件は16.5マイクロモルのシリンガルダジン、20.3mMのトリス／マレイン酸バッファの反応溶液中でpH7.5、30℃、反応時間1分とし、酵素活性域は0.0006～0.0028LAMU／mlである。

検出限界 (LOD) : 0.005LAMU／ml

定量検出限界 (LOQ) : 0.01LAMU／ml

測定域 : 0.01～0.044LAMU／ml

この計算は1分当りの吸収変化に基づき、これは酵素活性と比例し、反応時間及び酵素濃度と直接関係にある。

安定で均質なサンプルを活性レベルの決定のためのレベルコントロールサンプルとして用いる。レベルコントロールサンプルを希釈剤(1リットルにMilli-Qメスアップした50gのPEG 6,000)で0.025LAMU／mlの予測活性にまで希釈する。サンプルは分析前15分保存する。未知のラッカーゼ試験サンプルの分析を例えば<COBAS>;FARA遠心分析器で実施する。

<COBAS>;FARAプログラム

オペレーションT: 空ローターをセルキャビティー内の温度に至るまで回転させる。

オペレーションP: 25μlのレベルコントロールサンプル又は試験サンプル、20μlの脱ミネラル水(Milli-Q)及び325μlのバッファ(即ち、25mMのトリス／マレイン酸バッファ、pH7.5)をローター内の対応キャビティーに導入する。

オペレーションI: ローターが加速すると、バッファ及びサンプルはセル内で混合される。

オペレーションSR: 30μlの基質(即ち、0.56mMのシリンガルダジン)をローター内の最小キャビティーに導入する。

オペレーションA：ローターが加速し、そして遠心すると、気質はセル内で混合される。レベルコントロールサンプル及び未知のラッカーゼ試験サンプルの双方で25回の吸収測定を行う（5秒間隔）。12回目

及び24回目の吸収測定値（60～120秒）を Δ ABS／分の計算のために用いる。活性は<COBAS>FARA測定値に基づき〔U/ml〕として計算する。

以下の計算を行う：

$$\text{LAMU} / g = \frac{A \times \text{Vol} \times D}{W}$$

A = <COBAS>FARA測定平均値の〔U/ml〕〔LAMU/ml〕

Vol = サンプル希釈のために用いたチューブ〔ml〕

D = 溶解サンプルの希釈率〔ml/ml〕

W = 重量〔g〕

この活性値は下記の計算により活性値へと換算する。

$$A = F \times \Delta \text{ABS} / \text{min}$$

$\Delta \text{ABS} / \text{min}$ = <COBAS>FARAにより計算した、530nmで1分当りの吸収変化

$$F = \frac{V}{v \times E \times b}$$

$$F = \frac{0.400 \times 10^{-3} \times 10^{-3} *)}{0.025 \times 10^{-3} \times 0.065 \times 1.6}$$

$$F = 0.154 **)$$

*) 10^{-3} = マイクロモル／リッターからマイクロモル／mlへの変換

**) 1.6cmのサンプル経路にて

V = <COBAS>FARA中の反応混合物の総容量〔L〕

v = 反応混合物中の試験容量〔L〕

E = 530nmでのマイクロモラー励起係数〔0.065／1cmのサンプル経路（Baeur

, R. ら（1971）Anal. Chem. 43（3）421-5

）〕。

b = サンプル経路 (cm)。総容量Vは、1.6cmのセル内サンプル経路bに対応して400mlである。

実施例

実施例 1

至適pHでのバッファー中のポリアルコール抜きでのM. サーモフィララッカーゼ及びポリポルス・ピンシトウスラッカーゼの貯蔵安定性

M. サーモフィララッカーゼ及びポリポルス・ピンシトウスラッカーゼをその至適pH (即ち、pH6.5及び5.5、それぞれ) で40°Cで16日保存した。

M. サーモフィララッカーゼを25mMのトリス/HClバッファーに溶かし、そしてこのpHをpH6.5に調整し、1000LAMU/mlの活性にした。ポリポルス・ピンシトウスラッカーゼを25mMのMESバッファーに溶かし、そしてpHをpH5.5に調整し、1000LAMU/mlの活性にした。

溶解した酵素を4°C及び40°Cにそれぞれ置き、そしてサンプルを24時間、3日、7日及び16日目に分析するために取り出した。

比残留活性は4°Cに保った対応の製剤に関連する (ブラインド)、即ち、4°Cでの残留活性が100%の残留活性と考える。この試験の結果を図5に示す。

16日後、40°CでのM. サーモフィララッカーゼ及びポリポルス・ピンシトウスの比残留活性はそれぞれ3%及び8%であった。

実施例 2

ポリポルス・ピンシトウスラッカーゼの貯蔵安定性 (14日)

高度に精製されたポリポルス・ピンシトウスラッカーゼ (10LACU

/g) 及び2種類のポリアルコールを含んで成る液体製剤の貯蔵安定性をpH7.0、8.0及び9.0において試験した。

表1及び表2に示すサンプルを調製し、そして14日間保存した。保存後の残留ラッカーゼ活性を対応の条件下での4°Cのサンプルのラッカーゼ活性を基準に試験した。

表 1

製 剤	4℃ LACU / g	40℃ LACU / g	14日後の 残留活性
60% ソルビトール pH7.0	9.0	5.9	65%
60% ソルビトール pH8.0	9.7	7.9	82%
60% ソルビトール pH9.0	9.8	9.5	96%

表 2

製 剤	4℃ LACU / g	40℃ LACU / g	14日後の 残留活性
60% PBG 6,000 pH7.0	7.2	7.0	97%
60% PBG 6,000 pH8.0	8.7	7.6	88%
60% PBG 6,000 pH9.0	9.8	9.7	100%

表 1 及び表 2 からポリアルコールの存在下で改善された貯蔵安定性が得られることがわかる。

実施例 3

ポリポルス・ピンシトウスラッカーゼの貯蔵安定性（4週間）

実施例 1 記載の試験をPEG6,000について40℃で繰り返したが、貯蔵期間は4週間とした。

表 3

製 剤	4℃ LACU / g	40℃ LACU / g	14日後の 残留活性
60% PEG 6,000 pH7.0	7.4	2.2	29%
60% PEG 6,000 pH8.0	8.4	4.2	49%
60% PEG 6,000 pH9.0	8.8	5.7	65%

表 3 からわかる通り、4週間後では高めのpH値で大半の残留活性が保持されて

いた。

実施例 4

ミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼの貯蔵安定性

組換ミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼ(120LAMU/g)と30%又は60%のPEG 6,000及びPEG 600とを含んで成る液体溶液の貯蔵安定性をpH7.0, 8.0及び9.0において試験した。

下記の成分をこの試験において用いた：

A I : PEG 6000を30又は60%として

A II : PEG 600を30又は60%として

B : 20mMのトリス／マレイン酸バッファーでpH8.0又は9.0

貯蔵：製剤をゴムシール蓋の付いた20mlのサンプル容器の中で保存した。蓋を閉める前にこの容器を真空にし、そして真空はアルゴンで破った。このようにして製剤を不活性ガス雰囲気下で保存した。

貯蔵温度：4, 25及び40°C

サンプリング時期：1, 2及び4週間

表4はPEG 6000を含んで成る製剤の貯蔵安定性試験の結果を示す

表 4

PEG 6,000 製剤			
製 剤	週	25℃ % 残留活性	40℃ % 残留活性
30% PEG pH8.0	1	92.0%	76.0%
30% PEG pH8.0	2	92.8%	75.2%
30% PEG pH8.0	4	114.4%	37.8%
60% PEG pH8.0	1	94.8%	74.9%
60% PEG pH8.0	2	85.0%	59.2%
60% PEG pH8.0	4	103.6%	63.7%
30% PEG pH9.0	1	92.8%	90.7%
30% PEG pH9.0	2	100.4%	86.1%
30% PEG pH9.0	4	93.6%	78.2%
60% PEG pH9.0	1	108.5%	86.2%
60% PEG pH9.0	2	78.5%	69.2%
60% PEG pH9.0	4	82.9%	47.5%

PEG 600を含んで成る製剤の貯蔵安定性試験の結果を表5に示す。

表 5

PEG 600 製剤			
製 剤	週	25℃ % 残留活性	40℃ % 残留活性
30% PEG pH8.0	1	83.0%	9.9%
60% PEG pH8.0	1	86.3%	75.2%
60% PEG pH8.0	2	93.6%	78.5%
60% PEG pH8.0	4	76.5%	45.0%
30% PEG pH9.0	1	89.0%	11.3%
60% PEG pH9.0	1	89.0%	89.2%
60% PEG pH9.0	2	88.6%	92.7%
60% PEG pH9.0	4	84.9%	42.6%

表4及び表5からわかる通り、ポリアルコールとしてミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼ及びPEG 6,000又はPEG 600をポリアルコールとして含んで成る液体製剤は改善された貯蔵安定性を有する。更に、図1から、大半の残留酵素活性が30%のPEG 6,000を含んで成るpH9.0の製剤に関して維持される。

実施例5

ミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼの貯蔵安定性

ミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼ、モノプロピレングリコール(MPG)又はグリセロール及びバッファーを含んで成る液体製剤のpH9及び10での貯蔵安定性。

表6に示す下記の製剤は全て

- ・ 320~370LAMU/g
- ・ 0.2%のProxel

を含んで成る。

表 6

No.	安定化剤	pH	バッファー
1	20% MPG	9	0.05M ボラックス
2	20% MPG	9	0.05M リン酸塩
3	20% MPG	9	0.05M トリス/マレイン酸
4	20% MPG	10	0.05M グリシン
5	20% MPG	10	0.05M ボラックス
6	20% glycerol	9	0.05M トリス/マレイン酸
7	30% MPG	9	0.05M トリス/マレイン酸
8	20% MPG	9	NaOH
9 *	20% MPG	9	0.05M トリス/マレイン酸

*製剤no. 9は低温殺菌済み原材料を基礎とする。製剤no. 1～8は未処理原材料を基礎とする。

結果：

4週間の貯蔵後の残留活性を図2に示す。

活性値は全て同一期間内で4℃に保存した対照サンプルの平均値の活性のパーセンテージとして計算した（0、2及び4週目の結果に基づく平均値）。

これらの結果は、全ての製剤が25℃で4週間貯蔵後に活性の80%以上を維持することを示した。40℃で貯蔵後では、ボラックスpH9を含んで成る製剤及びブラインド（pHを9に調整し、そしてその他のバッファーは加えていないNaOH製剤）を除く全ての製剤も、初期活性の少なくとも80%を維持した。

実施例6

貯蔵安定性に対する様々なパラメーターの効果

・MPGをグリセロールに置き換える、及び

・MPGの量を増やす、及び

・低温殺菌済みの原材料を適用する、

ことの残留酵素活性に対する影響を試験した。

下記の製剤（表7に示す）を試験し、全て

・320～370LAMU／g

・0.2%のProxel（商標）

を含んで成る。

表 7

No.	安定化剤	pH	バッファー
1	20% MPG	9	0.05M トリス／マレイン酸
2	20% Glycerol	9	0.05M トリス／マレイン酸
3	30% MPG	9	0.05M トリス／マレイン酸
4 *	20% MPG	9	0.05M トリス／マレイン酸

*製剤4は低温殺菌済み原材料を基礎とする。

結果：

試験の結果を図3に示す。ミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼを含んで成る全ての液体製剤が4週間後に80%以上の残留活性を有していた。

実施例7

様々なpHでのM. サーマフィララッカーゼの貯蔵安定性

10%のMPG及び0.2%のProxel（商標）を含んで成る0.25Mのグリシンバッファーを含んで成る液体製剤中のミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼ(250LAMU／g)の残留活性を試験した。

この試験の結果を図4に示す。ラッカーゼはpH9.0で最も安定であり、25℃及び40℃のそれぞれでの4週間の貯蔵後に93%及び84%の活性が維持される。

実施例8

40℃で21週間のM. サーマフィララッカーゼの貯蔵

M. サーマフィララッカーゼを液体製剤1及び2それぞれの中で40℃で21週間保存した(pH9.0)。

製剤1：

250LAMU／g（又はg当り3.1mgの酵素タンパク質）

10%のw/wのプロピレングリコール

0.2%のProxel (商標)

0.25Mのグリシンバッファー (2Mのグリシンバッファー由来、pHは4NのNaOHでpH9.0に調整)

成分は全てよく攪拌し、pHはpH9.0±0.1に調整し、そして脱ミネラル水を最終容量となるまで加える。

製剤2:

250LAMU/g (又はg当り3.1mgの酵素タンパク質)

10% w/wのプロピレングリコール

3% w/wのグルコース

3% w/wのProxel (商標)

0.25Mのグリシンバッファー (2Mのグリシンバッファー由来、pHは4NのNaOHでpH9.0に調整)

成分は全てよく攪拌し、pHはpH9.0±0.1に調整し、そして脱ミネラル水を最終容量となるまで加える。

この試験の結果を4℃に保った対応の製剤 (ブラインド) と関連させ、即ち、4℃での残留活性を100%の残留活性と考慮した。

図6からわかる通り、40℃で20週間の貯蔵後、残留活性は製剤1 (10% w/wのプロピレングリコール) において約65%であり、そして製剤2 (10% w/wのプロピレングリコール+3% w/wのグルコース) では約90%であった。

【図1】

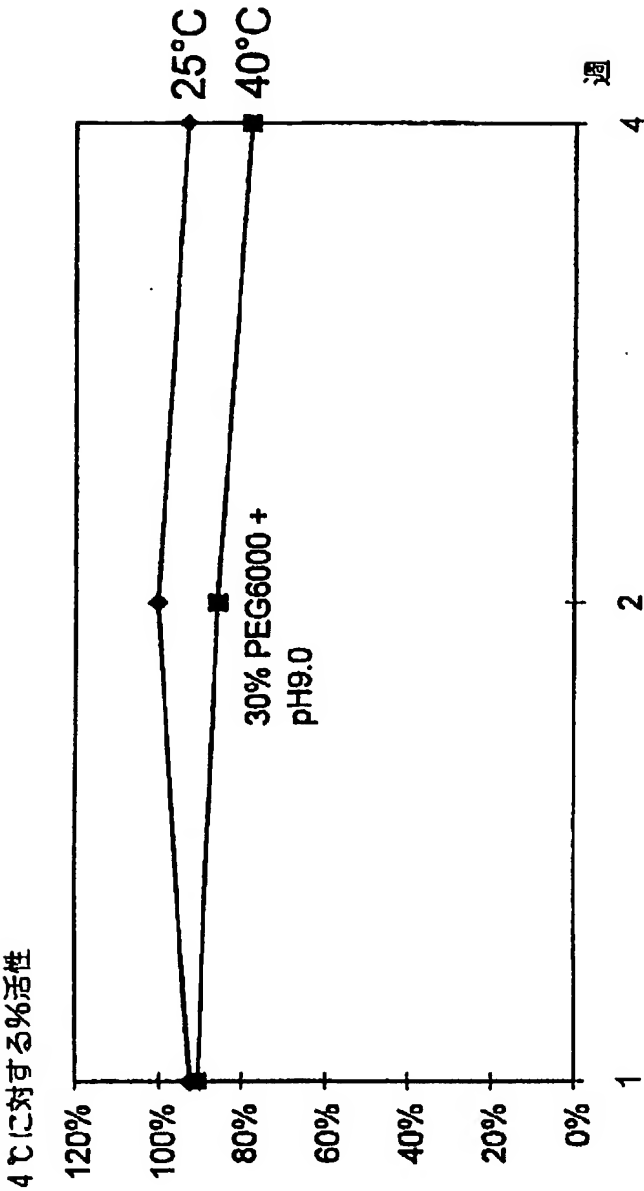


Fig. 1

【図2】

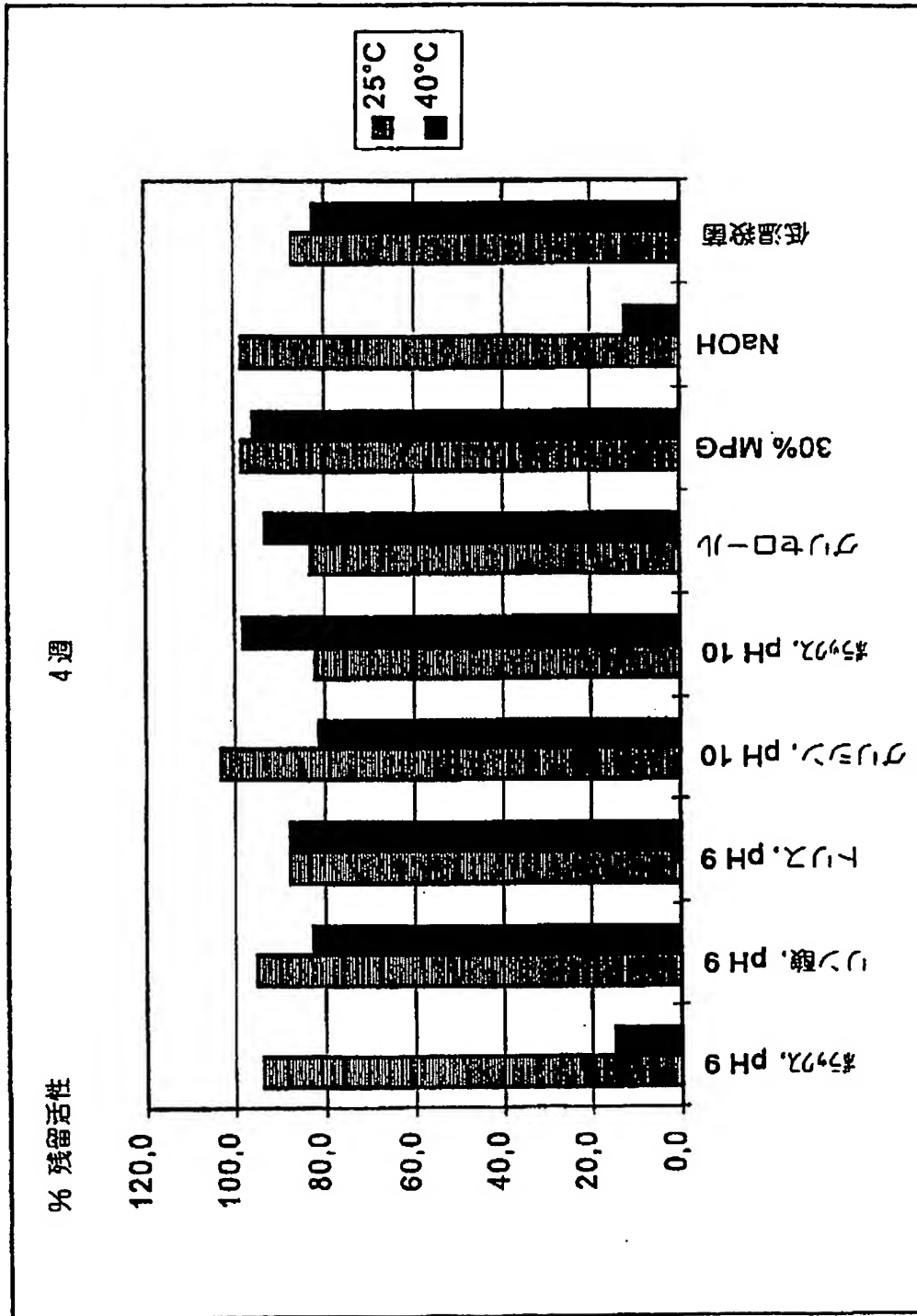


Fig. 2

【図3】

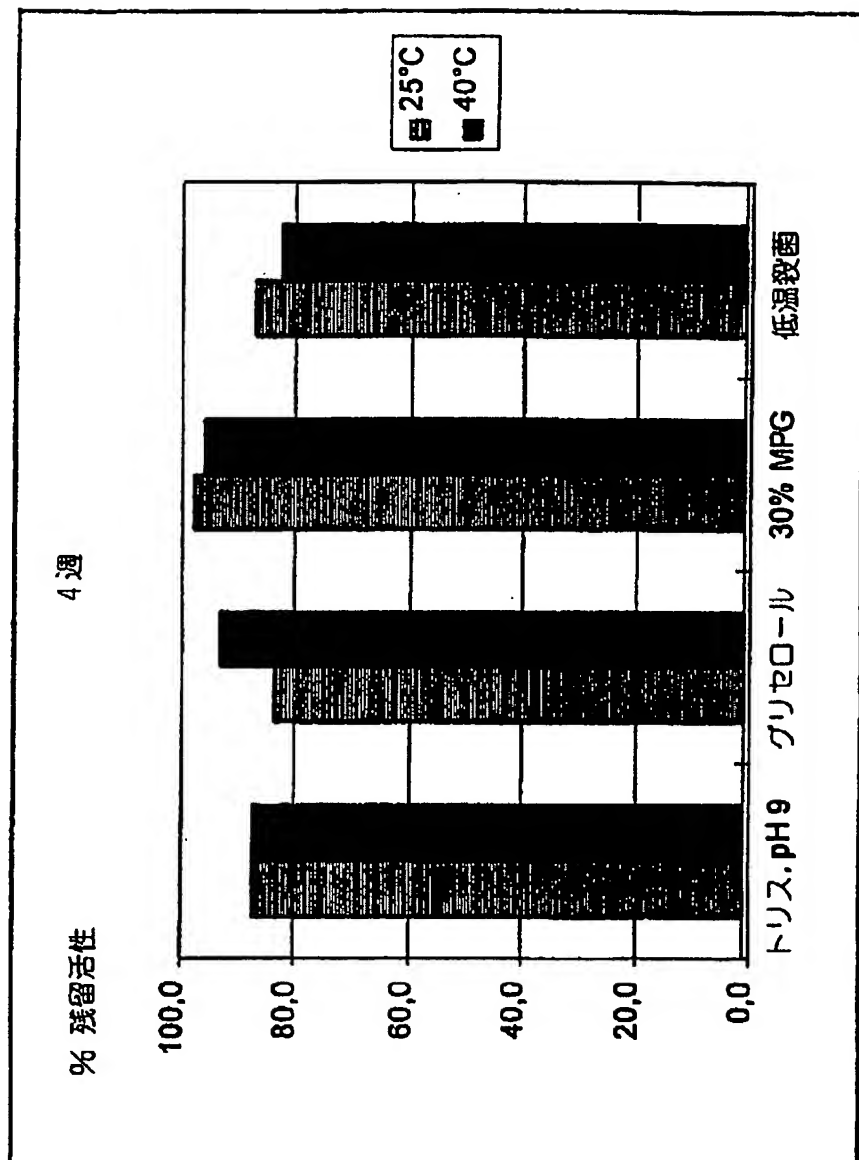


Fig. 3

【图4】

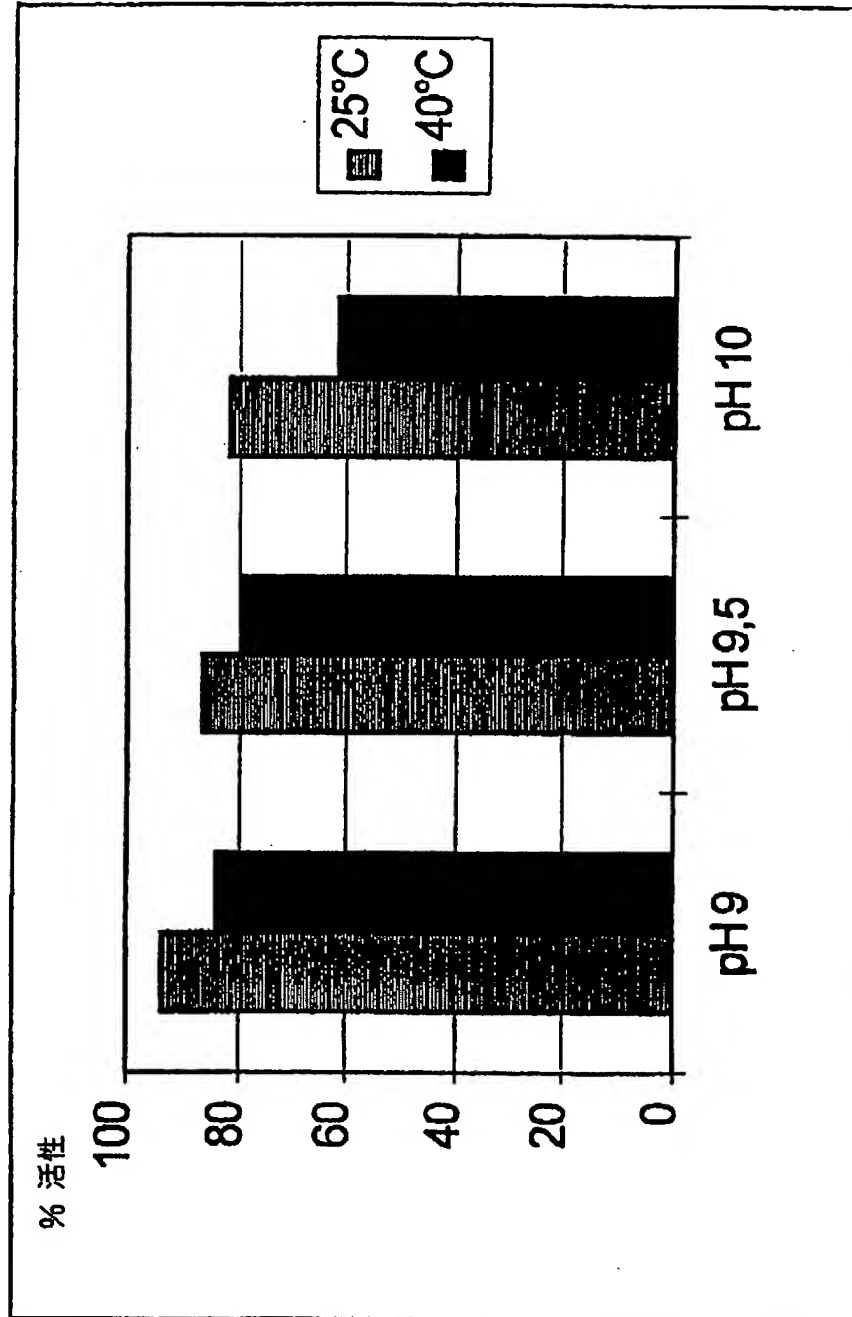


Fig. 4

【図 5】

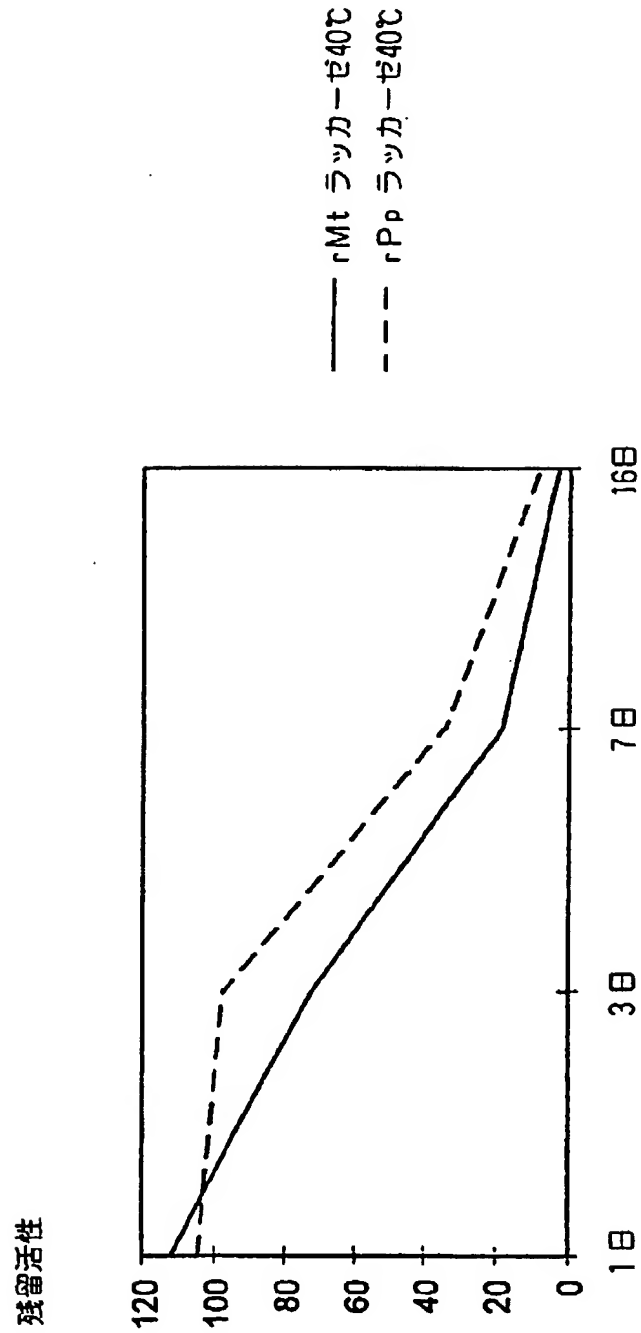


Fig. 5

【图6】

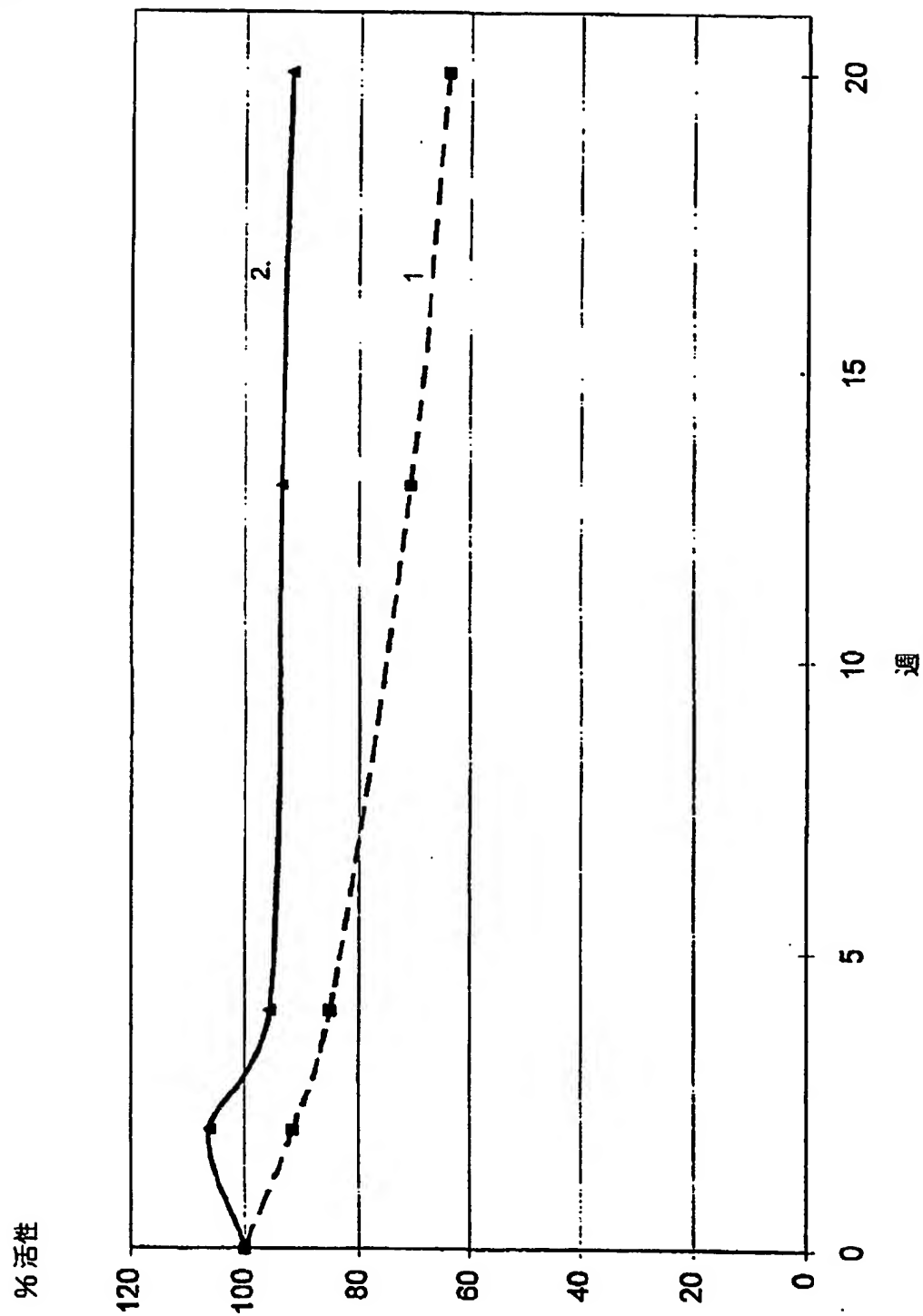


Fig. 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 98/00089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC6: C12N 9/02, C12N 9/96 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC6: C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI, MEDLINE, CA, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2235135 A (THE PROCTER & GAMBLE COMPANY), 24 January 1975 (24.01.75) --	1-20
A	File WPI, Derwent accession no. 96-203142, DAIWA KASEI KK: Thermally stable laccase produced by novel Basidiomycetes - used for removal of lignin by oxidative depolymerisation in pulp industry and for prodn. of synthetic lacquer"; & JP,A,8070861, 960319 --	1-20
A	File WPI, Derwent accession no. 97-206626, DAIWA KASEI KK: "Laccase II use to treat water - having specified mol. wt., optimum temp. thermal stability, optimum pH, stable pH and isoelectric point"; & JP,A,9056378, 970304 --	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 June 1998		26-06-1998
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Yvonne Siösteen Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 98/00089

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	File WPI, Derwent accession no. 97-206626, DAIWA KASEI KK: "Laccase II use to treat water - having specified mol. wt., optimum temp. thermal stability, optimum pH, stable pH and isoelectric point"; & JP,A,9056378, 970304 --	1-20
A	Dialog Information Services, file 434, Scisearch, Dialog accession no. 16392003, Shin KS et al: "Properties of laccase purified from nitrogen limited culture of white-rot fungus Coriolus hirsutus"; & Biotechnology Techniques, 1998, V12, N2 (FEB), P101-104 --	1-20
A	GB 1323819 A (AE STALEY MFG CO), 25 May 1971 (25.05.71) --	1-20
A	Patent Abstracts of Japan, Vol 11, No 222, C-435 abstract of JP 62-36189 A (TAIYO KAGAKU K.K.), 17 February 1987 (17.02.87) --	1-20
A	Patent Abstracts of Japan, Vol 10, No 335, C-384 abstract of JP 61-139384 A (NIPPON SHINYAKU CO LTD), 26 June 1986 (26.06.86) -- -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

09/06/98

International application No.
PCT/DK 98/00089

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2235135 A	24/01/75	BE 817108 A	02/01/75
		DE 2430699 A	16/01/75
		GB 1457155 A	01/12/76
		NL 7408763 A	31/12/74
		US 3944470 A	16/03/76
		US 4011169 A	08/03/77
GB 1323819 A	25/05/71	BE 768228 A	08/12/71
		CA 981606 A	13/01/76
		DE 2128135 A	16/12/71
		FR 2097842 A	03/03/72
		NL 7107664 A	10/12/71
		US 3761420 A	25/09/73

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72) 発明者 ヘンリクセン, ロッテ ルグホルム
デンマーク国, デーヨー—2880 バグスバ
エルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク
アクティーゼルスカプ

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.